

# 结核分枝杆菌 CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 抗原真核共表达载体的构建与表达

李武, 邓光存, 刘晓明, 王玉炯

宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021

李武, 邓光存, 刘晓明, 等. 结核分枝杆菌 CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 抗原真核共表达载体的构建与表达. 生物工程学报, 2014, 30(2): 265–273.

Li W, Deng GC, Liu XM, et al. Construction and expression of a eukaryotic vector co-expressing immunodominant antigens of CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Biotech, 2014, 30(2): 265–273.

**摘 要:** CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 是结核分枝杆菌的主要免疫优势抗原。为了构建一种可同时表达这 4 种抗原的真核多基因共表达载体 pcDNA-CFP10-ESAT6-Ag85A-Ag85B (pcDNA-CEAB), 并利用 HEK 293T 细胞对其体外表达进行检测。采用酶切、连接的方法, 将 CFP10 和 ESAT6 编码基因以 (Gly4Ser) 3 蛋白 Linker 连接, 插入至质粒 pcDNA3.1(+)-多克隆位点 CMV 启动子与加尾信号 BGH pA 之间, 使两者融合表达, 将 Ag85A 和 Ag85B 编码基因以内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 序列连接, 并赋予 RSV 启动子和加尾信号 BGH pA, 使两者在 RSV 启动子作用下独立表达。重组质粒经酶切及测序验证后转染至 HEK 293T 细胞中进行体外表达实验, 48 h 后提取总蛋白, 利用 CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 特异性抗体进行 Western blotting 检测。结果显示多基因共表达载体 pcDNA-CEAB 在真核细胞 HEK 293T 中得到表达, 且 CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 抗原能被相应的特异性抗体所识别, 表明质粒 pcDNA-CEAB 构建正确, 这为进一步研究其免疫原性和免疫保护效果奠定了基础。

**关键词:** 结核分枝杆菌, 优势抗原, 共表达, 蛋白免疫印迹

**Received:** April 24, 2013; **Accepted:** August 12, 2013

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB126301, 2012CB518801), National Natural Science Foundation of China (No. 31160515), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20126401110001), Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2012BAD12B07-4).

**Corresponding author:** Yujiong Wang. Tel/Fax: +86-951-2062033; E-mail: wyj@nxu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB126301, 2012CB518801), 国家自然科学基金 (No. 31160515), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20126401110001), 国家科技支撑计划项目 (No. 2012BAD12B07-4) 资助。

网络出版时间: 2013-09-12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130912.0214.005.html>

# Construction and expression of a eukaryotic vector co-expressing immunodominant antigens of CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis*

Wu Li, Guangcun Deng, Xiaoming Liu, and Yujiong Wang

Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** CFP10, ESAT6, Antigen 85A (Ag85A) and antigen 85B (Ag85B) are the key immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. In order to construct a eukaryotic vector able to co-express the four genes in one vector, we amplified the target gene fragments encoding the CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B antigens and inserted them into the multicloning site of the shuttle plasmid vector pcDNA3.1 (+), of which the CFP10 and ESAT6 encoding genes were in frame fused with a linker encoding (Gly4Ser)<sub>3</sub> residue, before the fused gene was inserted downstream of CMV promoter with a bovine growth hormone poly A(BGH pA) sequence at the 3'-end; Ag85A and Ag85B encoding genes were fused with a separation of internal ribosome entry site (IRES) sequence before the fused gene cassette was inserted downstream of RSV promoter with a BGH pA sequence at the 3'-end. The final plasmid containing all four genes was confirmed by sequence analysis and designated as pcDNA-CFP10-ESAT6-Ag85A-Ag85B (pcDNA-CEAB). In order to verify the ability of this construct to express target proteins, we then transfected the recombinant plasmid into Human embryonic kidney (HEK) 293T cells and harvested the cell lysates, and the cell lysates were then separated by SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis 48 h after transfection. All four of the target proteins were detected in the cell lysates against the respective specific antibodies, suggesting that we have successfully constructed a eukaryotic vector co-expressing the four immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, which lay a foundation for the further study of the immunogenicity and protective activity of the four antigens.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, immunodominant antigen, co-expression, Western blotting

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的慢性致死性人兽共患性传染病。据世界卫生组织估计,全世界大约有 1/3 的人群感染 MTB。近年来,随着多重耐药性菌株的不断出现,MTB 与艾滋病共感染等情况更加剧了全球结核病负担<sup>[1-2]</sup>。我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一,结核病人次数仅次于印度。对 TB 的防治目前仍然没有有效的手段,卡介苗 (Bacillus Calmette-Guerin, BCG) 虽然在全世界范围内广泛使用,但其免疫保护率在不同地区或人群中差异极大,从 0-80% 不等<sup>[3-4]</sup>,而且研究证实其保护时间不超过 15 年,加强免疫

的效果也不太明显<sup>[5]</sup>。因此,关于 TB 预防疫苗及其免疫机理的研究一直是个热点研究领域。但是,到目前为止,仍然没有取得理论及实践的突破。

近年来,随着 CFP10、ESAT6、Ag85A、Ag85B 等一些结核分枝杆菌优势抗原基因被克隆,这些基因随之被用于 DNA 疫苗、重组 BCG 疫苗、纳米疫苗等多种形式的结核病预防疫苗的研究中,且被证实具有很好的免疫保护效果<sup>[6-9]</sup>。但是,现有的研究中,多数研究者将这些基因串联起来进行融合表达。考虑到多基因融合表达可能对抗原的免疫原性产生影响。因此,本研究以质粒 pcDNA3.1(+) 为基础,引入双启动子和 IRES 序列,

构建共表达 MTB 免疫保护性抗原 CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 的重组质粒 pcDNA-CEAB, 最终实现在一个表达载体中共表达 4 种 MTB 优势抗原的目的。其中, Ag85A 和 Ag85B 独立表达, CFP10 和 ESAT6 以融合蛋白的形式进行表达, 以期为进一步研究它们的免疫原性和免疫保护效果奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及细胞

MTB 毒株 H37Rv 基因组 DNA, HEK 293T 细胞, 质粒 pcDNA3.1(+), pREP10、pIRES2-EGFP 等均由宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室保存; *Trans5α* 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 试剂

*EasyPfu* DNA 聚合酶、DNA 分子量 marker、蛋白 marker 等购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Afl*、*Bam*H、*Eco*R、*Not*、*Asc*、*Xho*、*Nhe*、*Xba*、*Bst*X、*Pme* 等购自 Fermentas 公司; 质粒小量提取试剂盒购自深圳市艾思进生物科技有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成; 核苷酸序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

胎牛血清、DMEM 培养基、转染试剂 Lipofectamine™ Plus 购自 Life Technologies 公司; anti-MTB CFP10、anti-MTB ESAT6、anti-MTB Ag85A 和 anti-MTB Ag85B 多克隆抗体购自 Abcam 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 凯基全蛋白提取试剂盒及凯基 BCA 蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基

生物科技发展有限公司; WesternBright™ ECL Western blotting 检测试剂盒购自 Advansta 公司。

### 1.3 目的基因的扩增

根据已经报道的 CFP10、ESAT6、Ag85A、Ag85B 抗原基因序列信息以及质粒 pIRES2-EGFP 中 IRES 基因序列信息和质粒 pREP10 中 RSV 启动子的序列信息, 结合质粒 pcDNA3.1(+) 多克隆位点限制性内切酶信息, 利用 Primer Premier5 软件设计并由上海生工生物工程技术有限公司合成了 7 对引物, 引物序列如表 1 所示。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 割胶纯化后进行酶切和连接反应。

### 1.4 重组质粒 pcDNA-CEAB 的构建

#### 1.4.1 质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6 的构建

用 *Afl* 和 *Eco*R 双酶切 CFP10 PCR 产物, 用 *Eco*R 和 *Not* 双酶切 ESAT6 PCR 产物, 用 *Afl* 和 *Not* 双切质粒 pcDNA3.1(+), 三者用 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜, 菌落 PCR 法挑取阳性克隆子, 酶切并测序验证。

#### 1.4.2 质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6-BGHpA-RSV 的构建

*Eco*R 和 *Asc* 双酶切 ESAT6 PCR 产物, *Asc* 和 *Not* 酶切 BGH pA PCR 产物, *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切质粒 pcDNA3.1(+), 三者用 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建重组质粒 pcDNA-ESAT6-BGHpA。然后用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pcDNA-ESAT6-BGHpA 和 RSV PCR 产物, 将 RSV 启动子插入到质粒 pcDNA-ESAT6-BGHpA 中, 构建重组质粒 pcDNA-ESAT6-BGHpA-RSV, 最后, 用 *Afl* 和 *Asc* I 酶切质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6, 回收 CFP10-ESAT6 片段, 同时用这两种酶酶切质粒 pcDNA-ESAT6-BGHpA-RSV, 切掉 ESAT6 基因, 将 CFP10-ESAT6 整体插入到质粒中, 构建质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6-BGHpA-RSV

表 1 目的基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primer sequences for the target genes

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction sites	Size (bp)
CFP10 forward	<b>GCTTAAGGCCACCATG</b> GCAGAGATGAAGACCG	<i>Afl</i>	303
CFP10 reverse	CCG <b>GAATTC</b> GAAGCCCATTTGCGAGGAC	<i>EcoR</i>	
ESAT6 forward	<b>CCGGAATTCGGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAG</b> <i>CGGCGGTGGCGGCAGCTCAACAGAGCAGCAGTGG</i>	<i>EcoR</i>	288
ESAT6 reverse	<b>TTGCGGCCGCGGCGCGCCCTATG</b> CGAACATCCCAGTG	<i>Not</i> / <i>Asc</i>	
Ag85A forward	<b>CGGCTAGCGCCACCATG</b> GTGCAGCTTGTGACAGG	<i>Nhe</i>	1 017
Ag85A reverse	CGGGATCCCTAGGCGCCCTGGGGCG	<i>BamH</i>	
Ag85B forward	<b>TTGCGGCCGCGCCACCATG</b> GTGACAGACGTGAGCCGA	<i>Not</i>	978
Ag85B reverse	TGCTCTAGACTAGCCGGCGCCTAA	<i>Xba</i> I	
BGH pA forward	<b>TTGGCGCGCCCTGTGCCTTCTAG</b> TTGCCAG	<i>Asc</i>	225
BGH pA reverse	<b>TTGCGGCCGCCC</b> ATAGAGCCACCGCAT	<i>Not</i>	
IRES forward	CGGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAA	<i>BamH</i>	585
IRES reverse	GAACCACA <b>ACCATGG</b> TTATCATCGTGTGTTTTCAAAGG	<i>BstX</i>	
RSV forward	ATTT <b>GCGGCCG</b> CCAATTCTCATGTTTGACAG	<i>Not</i>	570
RSV reverse	CCGCTCGAGGCTAGCGCCGGCAAGGCCGGATCCG	<i>Xho</i> / <i>Nhe</i>	

Bold face indicates the restriction site, and the underlined terms are the Kozak consensus sequence and the initiation codon, italic indicates the (Gly4Ser) 3 protein linker sequence.

(pcDNA-CEBR), 酶切并测序验证。

#### 1.4.3 质粒 pcDNA-Ag85A-IRES-Ag85B 的构建

利用设计好的酶切位点, 逐个将 Ag85A、IRES 和 Ag85B 基因插入到质粒 pcDNA3.1(+)中, 构建质粒 pcDNA-Ag85A-IERS-Ag85B(pcDNA-AIB), 菌落 PCR 法挑取阳性克隆子后直接测序验证。

#### 1.4.4 质粒 pcDNA-CEAB 的构建

重组质粒 pcDNA-CEBR 经 *Afl* 和 *Nhe* I 双酶切, 同时用 *Nhe* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pcDNA-AIB, *Afl* 和 *Xba* I 双酶切质粒 pcDNA3.1(+), 目的片段割胶回收后连接, 构建质粒 pcDNA-CEAB, 酶切及测序验证。

#### 1.5 HEK 293T 细胞转染及总蛋白提取

无内毒素大提质粒试剂盒大提质粒 pcDNA-CEAB。质粒转染前 1 天于 60 mm 细胞培

养皿中接种不同浓度的 HEK 293T 细胞, 次日选取 80%–90%融合的细胞进行转染。每 60 mm 细胞培养皿内细胞转染 20 μg 质粒 pcDNA-CEAB, 同时转染质粒 pcDNA3.1(+)作为阴性对照, 转染携带 GFP 的质粒 pIRES2-EGFP 作为阳性对照。转染采用 Lipofectamine™ Plus 试剂盒进行, 具体转染操作参照试剂盒说明书进行。

转染 48 h 后提取转染了质粒 pcDNA3.1(+)和重组质粒 pcDNA-CEAB 的细胞总蛋白, 采用凯基蛋白定量试剂盒进行定量后, 加 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水中煮沸 5 min 后分装, -20 °C 冻存备用。

#### 1.6 Western blotting 分析

蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳后(20 μg/泳道)转印至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 封闭液 (含 5%

脱脂牛奶的 TBST) 封闭 2 h 后,加一抗 (1:1 000 封闭液稀释) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入二抗 (1:5 000 封闭液稀释),室温孵育 2 h, TBST 洗膜 2 次后 PBS 洗膜 1 次,每次 10 min。用 ECL 试剂显色,暗室中用 X 光胶片曝光。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的扩增结果

以 MTB 毒株 H37Rv 基因组 DNA 为模板成功扩增了 4 种抗原基因,以质粒 pIRES2-EGFP 为模板成功地扩增 IRES 序列,以质粒 pREP10 为模板成功地扩增了 RSV 启动子序列,以 pcDNA3.1(+) 为模板成功地扩增了 BGH pA 序列。PCR 扩增结果如图 1 所示。

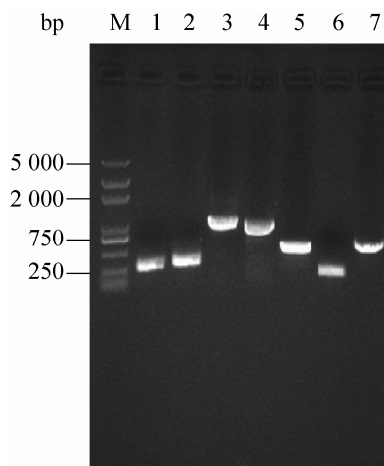


图 1 目的基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of the target genes. M: *Trans2k*<sup>TM</sup> plus DNA marker; 1: PCR products of CFP10; 2: PCR products of ESAT6; 3: PCR products of Ag85A; 4: PCR products of Ag85B; 5: PCR products of IRES; 6: PCR products of BGH pA; 7: PCR products of RSV.

### 2.2 重组质粒的酶切鉴定结果

#### 2.2.1 pcDNA-CFP10-ESAT6 的酶切鉴定结果

为了对质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6 进行酶切

鉴定,首先用 *Nhe* I 和 *Asc* I 双酶切该质粒,理论上能将 CFP10 和 ESAT6 融合基因整体从质粒上酶切下来,此外还用 *Eco*R I 和 *Asc* I 进行双酶切,看能否将 ESAT6 和 (Gly4Ser)<sub>3</sub> linker 从质粒上切下来,酶切结果 (图 2) 证实,质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6 构建正确。

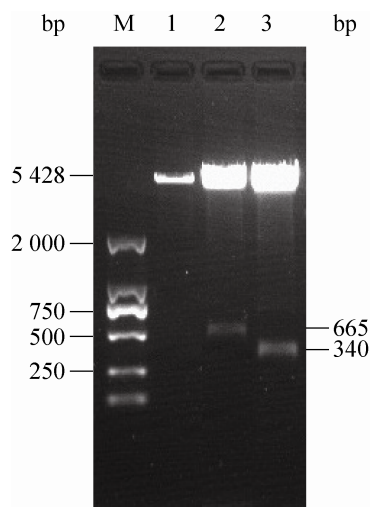


图 2 重组质粒 pcDNA-CFP10-ESAT6 的酶切电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid pcDNA-CFP10-ESAT6 by restriction endonuclease digestion. M: *Trans2k*<sup>TM</sup> DNA marker; 1: pcDNA3.1(+) digested with *Xho* I; 2: pcDNA-CFP10-ESAT6 digested with *Nhe* I and *Asc* I; 3: pcDNA-CFP10-ESAT6 digested with *Eco*R I and *Asc* I.

#### 2.2.2 pcDNA-CEBR 的酶切鉴定结果

由于插入片段 CFP10-ESAT6-BGHpA-RSV 两端各有一个 *Nhe* I 酶切位点,故采用 *Nhe* I 对该质粒进行单酶切验证。另外,还用 *Eco*R I 和 *Not* I 对质粒进行酶切,理论上应该能将 (Gly4Ser)<sub>3</sub> linker、ESAT6 和 BGH pA 整体从质粒上切下来,酶切片段大小与理论值相符,说明质粒构建正确,酶切结果如图 3 所示。

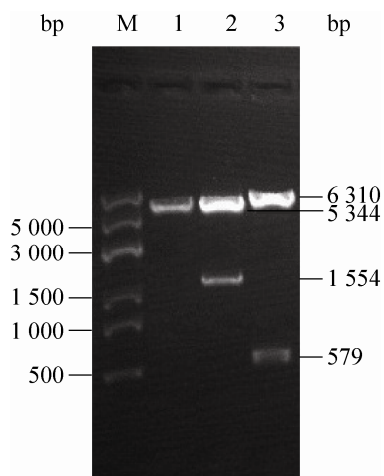


图3 重组质粒 pcDNA-CEBR 的酶切电泳结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid pcDNA-CEBR by restriction endonuclease digestion. M: *Trans8k* DNA marker; 1: pcDNA3.1(+) digested with *Xho* I; 2: pcDNA-CEBR digested with *Nhe* I; 3: pcDNA-CEBR digested with *EcoR* I and *Not* I.

### 2.2.3 pcDNA-CEAB 的酶切鉴定结果

质粒 pcDNA-CEAB (图4) 构建完成后, 首先用 *Pme* I 进行酶切验证, 看能否将 CFP10、ESAT6、BGH pA、RSV、Ag85A、IRES 和 Ag85B 序列整体切下来。另外, 考虑到 CFP10、Ag85A 和 Ag85B 基因内部各有一个 *Xho* I 酶切位点, 故用 *Xho* I 对质粒 pcDNA-CEAB 继续进行酶切验证, 酶切结果如图5所示, 各酶切片段大小与理论值相符。

### 2.3 Western blotting 分析结果

质粒转染 HEK 293T 细胞 48 h 后裂解细胞,

提取细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 电泳结果如图6所示。电泳后蛋白转印至 NC 膜上进行 Western blotting 分析。结果显示, 在约 26 kDa 位置处出现 CFP10 和 ESAT6 特异性抗体识别条带, 在约 32 kDa 和 34 kDa 位置处出现 Ag85A 抗体和 Ag85B 抗体识别条带, 表明所有蛋白均可以被相应的特异性抗体所识别, 结果如图7所示。

## 3 讨论

CFP10、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 是 MTB 的主要免疫优势抗原, 目前已被广泛用于 TB 疫苗的研究中<sup>[10-13]</sup>。其中, CFP10 和 ESAT6 是从 MTB 早期培养滤液中分离到的两种低分子量分泌蛋白, 它们都由结核分枝杆菌基因组 RD1 区编码, 同时翻译表达<sup>[14]</sup>。1996 年, Mahairas 等研究发现, 编码 CFP10 和 ESAT6 基因的 RD1 区只存在于致病性 MTB 菌株中, 而在 BCG 和非致病性 MTB 基因组中缺失<sup>[15]</sup>。这一研究发现使得 CFP10 和 ESAT6 基因在疫苗研究领域受到广泛关注, 而 BCG 免疫效果不佳, 可能与其在长期传代过程中丧失一些免疫优势抗原有一定关系。Ag85A 和 Ag85B 是 MTB 在生长过程中分泌到细胞外的两种主要的分泌性蛋白, 是从 Ag85 复合物中分离到的两种蛋白, 它们的分子量大小分别为 31 kDa 和 30 kDa<sup>[16]</sup>, 是 MTB 的两种重要的免疫保护性抗原, 它们既能诱导体液免疫应答, 又能诱导特异性 Th1 型细胞免疫应答, 具有良好的免疫保护作用<sup>[17-18]</sup>。疫苗研究

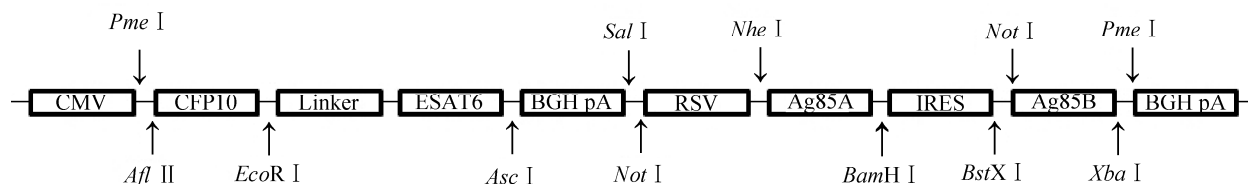


图4 重组质粒 pcDNA-CEAB 的结构模式图

Fig. 4 Ideograph of the recombinant plasmid pcDNA-CEAB.

中,这两种抗原基因也得到广泛的应用。因此,本研究选取这4种抗原基因构建真核共表达载体,并证实它们可以在真核细胞 HEK 293T 中表达。

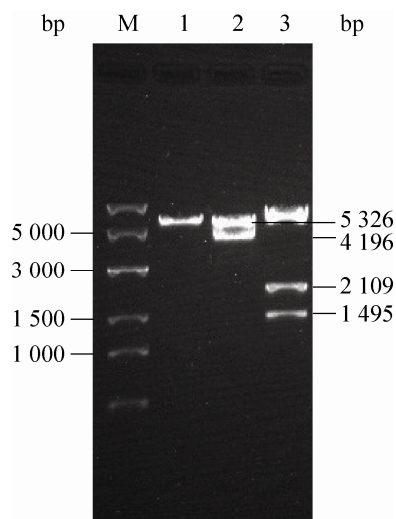


图5 重组质粒 pcDNA-CEAB 酶切电泳结果

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid pcDNA-CEAB by restriction endonuclease digestion. M: *Trans8K* DNA marker; 1: pcDNA3.1(+) digested with *Xho* I; 2: pcDNA-CEAB digested with *Pme* I; 3: pcDNA-CEAB digested with *Xho* I.

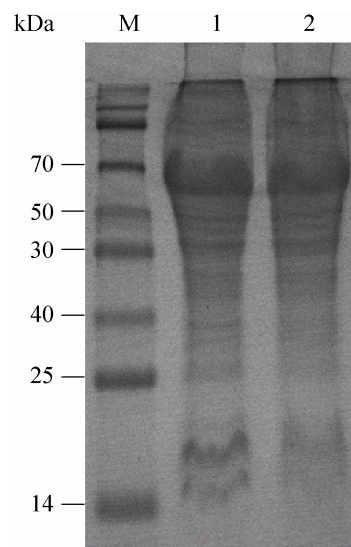


图6 质粒 pcDNA3.1(+)和 pcDNA-CEAB 转染 HEK 293T 细胞后目的蛋白表达情况 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of cell lysates from HEK 293T cells transfected with pcDNA3.1 (+) and pcDNA-CEAB. M: *Blue Plus*<sup>TM</sup> II protein marker; 1: cell lysates from HEK 293T cells transfected with empty vector pcDNA3.1 (+); 2: cell lysates from HEK 293T cells transfected with the recombinant plasmid pcDNA-CEAB.

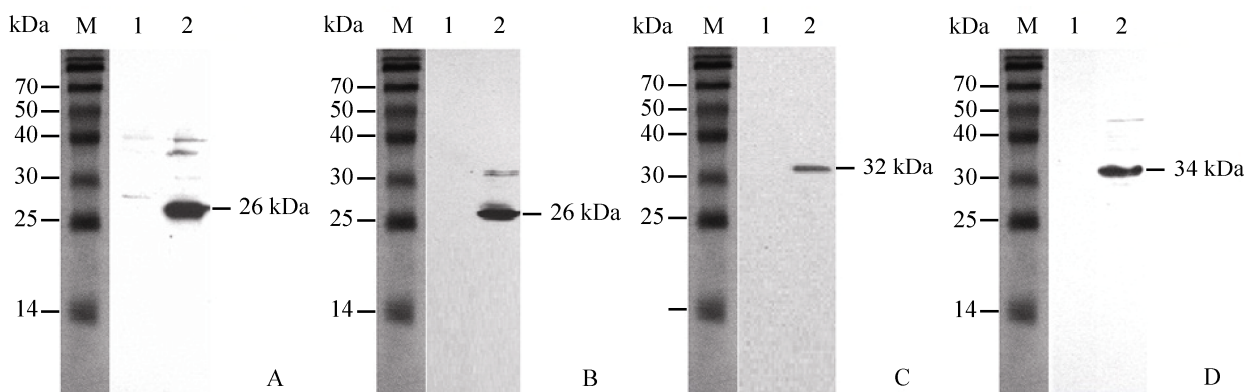


图7 质粒转染 HEK 293T 细胞后分别用 anti-CFP10(A)、anti-ESAT6(B)、anti-Ag85A(C) 和 anti-Ag85B(D) 多克隆抗体对基因在 HEK 293T 细胞中的表达情况进行 Western blotting 分析

Fig. 7 Western blotting analysis of cell lysates using anti-CFP10(A), anti-ESAT6(B), anti-Ag85A(C) and anti-Ag85B(D) antibody, respectively. M: *Blue Plus*<sup>TM</sup> II protein marker; 1: cell lysates from HEK 293T cells transfected with empty vector pcDNA3.1 (+); 2: cell lysates from HEK 293T cells transfected with recombinant plasmid pcDNA-CEAB.



CFP10 和 ESAT6 抗原的分子量较小,分子量太小对抗原免疫原性存在一定的影响。对于这两种蛋白,多数研究者采用融合蛋白的形式进行表达。因此,我们也采用基因融合技术,将二者以蛋白 linker 连接起来,以融合蛋白的形式进行表达。在蛋白 linker 的选择方面,我们选择目前已被广泛使用的(Gly4Ser)<sub>3</sub> 蛋白 linker<sup>[19-21]</sup>。而对 Ag85A 和 Ag85B 蛋白而言,其分子量大小适中,适合单独表达,研究也证实它们具有诱导机体产生特异性 Th1 型细胞免疫应答的能力<sup>[22-24]</sup>。为了实现这两种蛋白的独立表达,我们利用 IRES 序列将两者相连。目前,来源于脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 元件已被广泛使用于带有报道基因的真核表达载体中,它能招募核糖体启动其下游基因的翻译表达<sup>[25]</sup>。实践证明,通过引入 IRES 序列,我们最终成功地利用一个 RSV 启动子,实现了对 Ag85A 和 Ag85B 蛋白的独立表达。

总之,本研究成功地构建了双启动子共表达载体 pcDNA-CEAB,并利用(Gly4Ser)<sub>3</sub> 蛋白 linker 实现了 CFP10 和 ESAT6 的融合表达,利用 IRES 序列实现了 Ag85A 和 Ag85B 蛋白的独立表达。最终,在同一个载体中共表达了 MTB 四种优势抗原基因,并且在 HEK 293T 细胞中对它们的体外表达进行了验证,为进一步研究这几种抗原的免疫原性和免疫效果奠定了基础。另外,本研究构建的载体系统本身已被证明是一个良好的多基因共表达系统,也可以用作研究其他基因共表达的工具,尤其是在多价疫苗的研制中可能发挥一定的作用。

## REFERENCES

- [1] Dye C, Espinal MA, Watt CJ, et al. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*, 2002, 185(8): 1197-1202.
- [2] Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med*, 2007, 13(3): 295-298.
- [3] Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG—implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(8): 656-662.
- [4] Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*, 1995, 346(8986): 1339-1345.
- [5] Fine PEM. BCG: the challenge continues. *Scand J Infect Dis*, 2001, 33(4): 243-245.
- [6] Rowland R, Pathan AA, Satti I, et al. Safety and immunogenicity of an FP9-vectored candidate tuberculosis vaccine (FP85A), alone and with candidate vaccine MVA85A in BCG-vaccinated healthy adults: a phase I clinical trial. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9(1): 50-62.
- [7] Yuan W, Dong N, Zhang L, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice. *Vaccine*, 2012, 30(14): 2490-2497.
- [8] Lu Y, Xu Y, Yang E, et al. Novel recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and Rv2608 elicits significantly enhanced cellular immune and antibody responses in C57BL/6 mice. *Scand J Immunol*, 2012, 76(3): 271-277.
- [9] Yu F, Wang J, Dou J, et al. Nanoparticle-based adjuvant for enhanced protective efficacy of DNA vaccine Ag85A-ESAT-6-IL-21 against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nanomedicine*, 2012, 8(8): 1337-1344.
- [10] Van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. *Vaccine*, 2011, 29(11): 2100-2109.
- [11] You Q, Wu Y, Wei W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of heterologous prime-boost regimens with mycobacterial vaccines and recombinant adenovirus- and poxvirus-vectored vaccines against murine tuberculosis. *Int J Infect Dis*, 2012, 16(11): e816-e825.
- [12] You Q, Jiang C, Wu Y, et al. Subcutaneous administration of modified vaccinia virus ankara expressing an Ag85B-ESAT6 fusion protein, but not



- an adenovirus-based vaccine, protects mice against intravenous challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol, 2012, 75(1): 77–84.
- [13] Todoroff J, Lemaire MM, Fillee C, et al. Mucosal and systemic immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A following its co-delivery with CpG, MPLA or LTB to the lungs in mice. PLoS ONE, 2013, 8(5): e63344.
- [14] Berthet F-X, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology, 1998, 144(11): 3195–3203.
- [15] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J Bacteriol, 1996, 178(5): 1274–1282.
- [16] Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol Mol Biol Rev, 1992, 56(4): 648–661.
- [17] Spencer AJ, Hill F, Honeycutt JD, et al. Fusion of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A to an oligomerization domain enhances its immunogenicity in both mice and non-human primates. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33555.
- [18] Meyer J, Harris SA, Satti I, et al. Comparing the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine MVA85A administered by intramuscular and intradermal delivery. Vaccine, 2013, 31(7): 1026–1033.
- [19] Zhang L, Zhang H, Zhao Y, et al. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 fusion protein on the autophagy function of mouse macrophages. DNA Cell Biol, 2012, 31(2): 171–179.
- [20] Zhou H, Fisher RJ, Papas TS. Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. Nucleic Acids Res, 1994, 22(5): 888–889.
- [21] Wu X, Li Q, Yang Y, et al. Latent tuberculosis infection amongst new recruits to the Chinese army: Comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test. Clin Chim Acta, 2009, 405(1): 110–113.
- [22] Dou J, Wang Y, Yu F, et al. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice by DNA vaccine Ag85A-ESAT-6-IL-21 priming and BCG boosting. Int J Immunogenet, 2012, 39(2): 183–190.
- [23] Wang D, Xu J, Feng Y, et al. Liposomal oral DNA vaccine (*Mycobacterium* DNA) elicits immune response. Vaccine, 2010, 28(18): 3134–3142.
- [24] Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells. Eur J Immunol, 2010, 40(1): 279–290.
- [25] Lu J, Zhang JM, Lin MJ, et al. IRES: translation element of RNA viruses. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(7): 513–518 (in Chinese).
- 卢杰, 张珈敏, 林美娟, 等. RNA 病毒翻译调控元件—内部核糖体进入位点 (IRES). 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(7): 513–518.

(本文责编 郝丽芳)